保幼激素对昆虫变态发育调控的分子机制

何倩毓[1]，张原熙[2]，裴泽华[3]，李美鑫[1]，张　旭[1,*]

（1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163319；2. 大庆市环保局环境监测中心站，黑龙江大庆 163316；
3. 黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163319）

摘要：近年来随着保幼激素(juvenile hormone, JH)核受体 Methoprene tolerant (Met)被鉴定,JH 对昆虫变态发育调控的分子机制的研究取得了极大的进展。本文在介绍 Met 的鉴定以及分子伴侣 Hsp83 和核孔蛋白 Nup358 对 Met 亚细胞定位调控的基础上,重点阐述了 JH-Met-Kr-h1-Br 信号通路在完全变态昆虫幼虫至蛹变态过程中的作用以及 JH-Met-Kr-h1-E93 信号通路在不完全变态昆虫和完全变态昆虫成虫羽化过程中的作用。此外,Met 与蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)受体复合物 EcR/USP 的结合、Tai/SRC/FISC 分别与 Met 和 EcR/USP 结合形成 JH 功能受体和 20E 功能受体复合物、JH 对 20E 下游基因 *E75A* 的诱导以及 USP 与 JH 的结合等分子间的相互作用在 JH 与 20E 的互作中所产生的影响也将逐一进行论述。本文还对 JH 通过膜受体激活 PKC 和 PLC 等下游信号通路而发挥生理功能的研究进展进行了概述。

关键词：保幼激素；受体；变态发育；分子机制；膜受体；信号通路

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2017)05-0594-10

Molecular mechanisms of juvenile hormone in insect metamorphosis

HE Qian-Yu[1], ZHANG Yuan-Xi[2], PEI Ze-Hua[3], LI Mei-Xin[1], ZHANG Xu[1,*] (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 2. Environmental Monitoring Center Station, Daqing Environmental Protection Agency, Daqing, Heilongjiang 163316, China; 3. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: Since Methoprene tolerant (Met) was identified as the juvenile hormone receptor, great progress has been made in understanding the molecular mechanisms of juvenile hormone (JH) in insect metamorphosis. In this article, we summarized the identification of Met and the regulation of chaperone protein Hsp83 and Nuclearporin Nup358 on Met cellular localization, focusing on the roles of JH-Met-Kr-h1-Br signal pathway in larval-pupal metamorphosis of holometabolous insects, and JH-Met-Kr-h1-E93 signal pathway in adult metamorphosis of hemimetabolous and holometabolous insects. Moreover, the roles of many molecular interactions in JH-20E crosstalk were discussed. These interactions include the binding between Met and 20-hydroxyecdysone nuclear receptor EcR/USP, the interaction of Tai/SRC/FISC with Met and EcR/USP to form JH and 20E functional receptors respectively, the activation of JH on 20E responsive gene *E75A*, and the association between JH and USP. The research progress of the mechanism that JH plays its physiological function through binding to the membrane receptor to activate PKC and PLC signalling was also overviewed.

Key words: Juvenile hormone; receptor; metamorphosis; molecular mechanism; membrane receptor; signal pathway

基金项目：国家自然科学基金项目(31501899)；黑龙江省自然科学基金项目(C2016040)；中国博士后基金(2016M591558)；黑龙江八一农垦大学科研启动基金(XYB2015-07)

作者简介：何倩毓，女，1986 年 10 月生，江西抚州人，博士，讲师，研究方向为昆虫变态发育的激素调控，E-mail：heqianyu2005@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：zx906027_2000@126.com

收稿日期 Received：2017-02-07；接受日期 Accepted：2017-04-10

昆虫之所以进化成为世界上种类最多的种群，主要得益于其多样的生存与变态方式。昆虫变态是指昆虫胚后发育过程中从幼虫到成虫所经历的形态和生理上的剧烈变化，包括幼虫特有组织或器官的瓦解以及成虫器官的快速重建。昆虫的变态可分为不完全变态和完全变态。不完全变态昆虫的胚后发育仅经历若虫和成虫两个阶段，而完全变态昆虫的胚后发育需要经历幼虫至蛹以及蛹至成虫两个蜕变过程。研究表明，昆虫变态主要是由保幼激素（juvenile hormone, JH）和蜕皮激素（20-hydroxyecdysone, 20E）协同控制。20E 诱导昆虫的蜕皮和变态，JH 则阻止 20E 引起的变态，使幼虫蜕皮之后仍然维持幼虫的状态。在末龄幼虫（不完全变态昆虫又称为若虫）阶段，JH 滴度显著降低或缺失，导致完全变态昆虫蜕皮化蛹、不完全变态昆虫羽化成成虫（Dubrovsky, 2005；Bernardo and Dubrovsky, 2012；Belles and Santos, 2014）。20E 对昆虫变态发育调控的分子机制早已被证明是通过其受体复合物 EcR-USP 与靶基因启动子区域中的蜕皮激素反应元件（ecdysone response element, EcRE）结合后，启动一系列的级联反应从而调控蜕皮或变态相关基因的表达（Dubrovsky, 2005）。相对于 20E，JH 对昆虫变态发育调控的分子机制的研究直到近几年其受体 Methoprene tolerant（Met）被鉴定后才逐渐被阐明。本文就近年来有关 Met 的鉴定及亚细胞定位调控，JH 调控昆虫变态的分子机制，JH 与 20E 的交互作用以及 JH 膜受体的最新研究进展作一综述。

1　JH 受体 Met 的相关研究

1.1　Met 的鉴定

Met 属于 bHLH-PAS 转录因子家族成员（Ashok *et al*., 1998），最早是由 Wilson 和 Fabian（1986）在筛选出的耐受保幼激素类似物 Methoprene 的果蝇突变体中发现的。相对正常果蝇，*Met* 突变体对 Methoprene 和 JH Ⅲ 的耐受力高达 100 倍，并且 *Met* 突变体可抑制 Methoprene 诱导的果蝇幼虫假瘤（pseudotumor）的形成以及成虫卵母细胞的发育（Wilson and Fabian, 1986）。但是 *Met* 的无义突变体 Met^{27} 除了成虫产卵能力下降，胚后发育却基本正常（Wilson and Ashok, 1998；Abdou *et al*., 2011），这与 Met 作为 JH 受体应有的表型是相矛盾的。进一步研究发现，果蝇中存在 *Met* 的一个旁系同源基因 *Germ cell-expressed*（*Gce*），二者编码的蛋白在 bHLH, PAS A 和 PAS B 结构域内的氨基酸序列一致性分别为 78%，68% 和 86%（Moore *et al*., 2000）。通过内含子数目和位置比对及进化分析表明，果蝇 *Met* 是进化过程中通过 *Gce* 复制产生的。相对于 *Met*，果蝇 *Gce* 与其他昆虫中的 *Met* 同源性更高（Baumann *et al*., 2010b）。此外，Gce 和 Met 具有部分的功能重叠性。*Gce* 无义突变果蝇 $gce^{2.5k}$ 的表型类似于 Met^{27}，表现为对 Methoprene 的耐受，可正常成活及产卵能力的下降（Abdou *et al*., 2011），但上述表型均弱于 Met^{27} 的表型。而超表达 *Gce* 能显著提高 Met^{27} 对 Methoprene 的敏感性（Baumann *et al*., 2010a），并且 *Met/Gce* 双突变果蝇 $Met^{27}gce^{2.5k}$ 可在预蛹期死亡（Abdou *et al*., 2011），表型类似于 JH 缺失果蝇的表型（Liu *et al*., 2009），而该致死表型可被 *Met* 或 *gce* 转基因果蝇所挽救（Abdou *et al*., 2011）。以上结果证实 Met^{27} 存活是由于 Met 与 Gce 存在功能冗余导致的。然而二者在视神经叶发育中又具有不同的功能。咽侧体遗传摘除果蝇及 Met^{27} 果蝇中均出现成虫视神经叶提早分化现象，但在 $gce^{2.5k}$ 果蝇中却未能观察到类似表型（Riddiford, 2012），表明 JH 仅通过 Met 调控果蝇预蛹期视神经叶的发育。

家蚕 *Bombyx mori* 中同样含有 2 个 *Met* 基因，即 *Met*1 和 *Met*2（Guo *et al*., 2012；Kayukawa *et al*., 2012）。最近的研究发现，基于 TALEN 技术获得的家蚕 *Met*1 突变体在 2 – 3 龄幼虫蜕皮过程中死亡，并且在 3 龄幼虫表皮特定区域中可见点状的蛹壳特征；相反，*Met*2 突变体可正常成活，未表现出任何的异常表型（Daimon *et al*., 2015），说明在家蚕幼虫阶段，主要是 Met1 介导 JH 的变态拮抗功能。在仅含有 1 个 *Met* 基因的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中，分别在 3 龄或 4 龄幼虫期注射 *Met* 的双链 RNA 可导致幼虫在 5 龄或 6 龄时期提前变态（Konopova and Jindra, 2007；Parthasarathy *et al*., 2008）。同样，在不完全变态昆虫始红蝽 *Pyrrhocoris apterus* 或德国小蠊 *Blattella germanica* 中也发生由 *Met* RNAi 导致的提前变态现象（Konopova *et al*., 2011；Lozano and Belles, 2011）。以上这些表现均类似于 JH 缺失的表型。

体外结合实验表明，果蝇 Met 或 Gce 以及赤拟谷盗 Met 均与生理水平浓度的 JH Ⅲ 具有高亲和力，并且 JH 的结合位点位于 Met 或 Gce 的 PAS B 结构域（Charles *et al*., 2011；Jindra *et al*., 2015）。当 JH 不存在时，Met-Met 或 Met-Gce 形成同源或异源二聚体，一旦 JH 结合上 Met，可导致 Met-Met 或 Met-Gce

二聚体的解离(Godlewski *et al*., 2006; Charles *et al*., 2011),Met 则与 bHLH-PAS 转录因子家族的其他成员结合形成功能复合体,如 Taiman/类固醇激素受体共激活物(steroid receptor coactivator, SRC)/与 βFtz-F1 结合的类固醇激素受体共激活物(βFtz-F1 interacting steroid receptor coactivator, FISC)或 Cyclin(CYC)等。随后 Met 功能复合体与 JH 调控的靶基因启动子区域的 JH 反应元件(JH response element, JHRE)(核心序列为 E box:CACGTG)结合,最终调控靶基因(如 *Kr-h*1)的表达(Li *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2011; Shin *et al*., 2012; He *et al*., 2014)(图 1)。最近果蝇遗传学上的证据表明,Met/Gce 与 JH 的结合是 JH 正常发挥其生理作用所必需的。在 Met^{27} 突变体背景下超表达野生型 *Met* 或 *Gce* 可显著提高 Met^{27} 突变体对 Methoprene 的敏感性,而若超表达 JH 结合位点突变的 *Met* 或 *Gce* 则不影响 Met^{27} 对 Methoprene 的耐受性以及突变体的存活率(Jindra *et al*., 2015)。此外,*Met*/*Gce* 双突变果蝇 $Met^{27}gce^{2.5k}$ 预蛹期死亡表型可被野生型 Met 或 Gce 所挽救(Abdou *et al*., 2011; Jindra *et al*., 2015),而 JH 结合位点突变的 Met 或 Gce 不具备该挽救能力(Jindra *et al*., 2015)。同时,相对于 JH 结合位点突变的 Met 或 Gce,野生型 Met 或 Gce 可显著提高 $Met^{27}gce^{2.5k}$ 突变体中 JH 下游初级反应基因 *Kr-h*1 的表达(Jindra *et al*., 2015)。基于以上研究结果,Met(或 Gce)是 JH 的核受体已被学术界广泛认可。

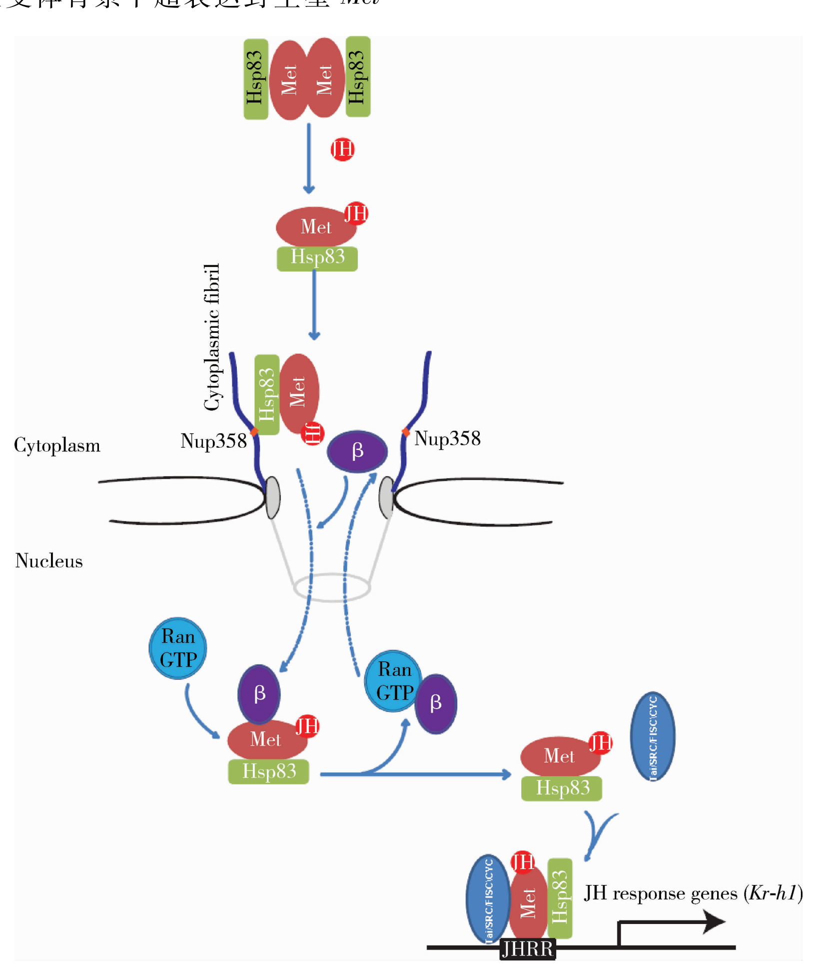


图 1　Met 入核及功能模式图(改自 He *et al*., 2017)

Fig. 1　Model for the nuclear import and function of Met (adapted from He *et al*., 2017)

1.2　Met 的亚细胞定位调控

作为核受体,Met 的亚细胞定位与其活性密切相关。早期果蝇 S2 细胞上的研究表明,无论 JH 是否存在,Met 始终处于细胞核中(Miura *et al*., 2005)。Shemshedini 和 Wilson (1990)研究发现,*Met* 突变果蝇之所以对 Methoprene 耐受是由于该突变果蝇脂肪体细胞质内的蛋白质与 JH Ⅲ 的结合能力低于正常果蝇,该蛋白质后续被证明是 Met

(Ashok *et al*., 1998)。这一结果表明 Met 在细胞质与细胞核中均有分布。对 Met 氨基酸序列分析发现 Met 的 PAS A 和 PAS B 结构域中均含有一个入核信号肽(nuclear localization signal, NLS)和一个出核信号肽(nuclear export signal, NES),除此之外,在 C 末端结构域中还含有一个 NES (Greb-Markiewicz *et al*., 2011)。Met 蛋白中多个 NLS 和 NES 暗示 Met 在细胞内的定位并不是固定的,而是在细胞质与细胞核中动态穿梭。利用非洲绿猴肾细胞 COS-7 进行研究发现,PAS A 结构域中的 NLS 的效果强于其他 NLS 和 NES,无论 JH 是否存在,Met 主要定位在细胞核内,即导致非 JH 依赖的 Met 入核现象;而位于 PAS B 结构域中的 NLS 则表现出 JH 依赖的 Met 入核,当 PAS A 结构域中的 NLS 缺失时,Met 主要位于细胞质中,但加入 JH 可导致 Met 从细胞质转移到细胞核内(Greb-Markiewicz *et al*., 2011)。与细胞上的研究结果不同,果蝇虫体上的研究表明,Met 的亚细胞定位受 JH 的严格调控。在 JH 滴度较高的游走早期,Met 主要定位于细胞核中;而在 JH 滴度较低的 3 龄第 2 天幼虫期,Met 主要分布于细胞质中,体外添加 Methoprene 可促进 Met 由细胞质转移到细胞核中(He *et al*., 2014)。此外,药物处理以及果蝇遗传实验证明 JH 促进 Met 细胞核定位依赖于分子伴侣 Hsp83。在游走早期,加入 Hsp83 抑制剂格尔德霉素(Geldanamycin, GA)可阻碍 Met 在细胞核内的定位。同样在 *Hsp*83 RNAi 果蝇或纯合突变果蝇 *Hsp*83^{08445}游走早期脂肪体细胞中,Met 细胞核定位信号也是显著降低的(He *et al*., 2014)。Met 入核受阻导致 Met 与 JH 反应元件的结合能力下降(何倩毓和张原熙, 2016)。最近,我们的研究进一步证明 JH-Hsp83 对 Met 入核的调控依赖于 Hsp83 与核孔蛋白 Nup358 N 端的肽重复序列结构域(tetratricopeptide repeat, TPR)的结合。研究发现,超表达 TPR 可抑制 Hsp83 与内源性 Nup358 的结合从而阻碍了游走早期 Met 的细胞核定位(He *et al*., 2017)。综上所述,与其他核受体类似,Met 的亚细胞定位也是受其配体的调控。当 JH 不存在时,Met 主要以同源二聚体的形式位于细胞质中;当 JH 存在时,Met 与 JH 结合,Met-Met 二聚体解离,JH-Met 在其他辅助蛋白(Hsp83 和 Nup358)的协助下,通过核孔进入细胞核内最终发挥其转录因子的作用(图 1)。对于 Gce 的研究同样也发现 Gce 既含有 NLS,也含有 NES。但是不同于 Met,在无 JH 存在时,Gce 是均匀分布在 COS-7 细胞的细胞质与细胞核中。并且 Gce 的入核被证明是受 JH 和 14-3-3 蛋白的调控(Greb-Markiewicz *et al*., 2015)。作为转录因子,Met/Gce 的活性与其细胞核定位密切相关。在入核过程中,涉及 Met/Gce 构象的改变、转运载体的结合及解离以及其他辅助蛋白的参与等等,这些机制都有待于我们进一步的挖掘。

2　JH 对昆虫变态发育调控的分子机制

2.1　JH-Met-Kr-h1-Br 信号通路

近年来在完全变态昆虫果蝇和赤拟谷盗中的研究发现,JH 可通过受体 Met(或 Gce)上调 *Kr-h*1 基因的表达从而抑制 20E 诱导的蛹期特异分子 Br (Broad)的表达,进而发挥其阻止变态或"维持现状(status quo)"的作用(Minakuchi *et al*., 2009; Abdou *et al*., 2011)。其中 *Kr-h*1 和 *Br* 分别是 JH 和 20E 信号通路中调控全变态昆虫变态发育的 2 个关键基因。Br 是 N 端具有 BTB (Bric-a-brac-Tramtrack-Broad)结构域,C 端含有可与 DNA 结合的 C_2H_2 锌指结构的转录因子(Bayer *et al*., 1996)。由于可变剪切及启动子的不同,Br 含有多个同型异构体。这些异构体有各自的时空表达模式,共同调控昆虫的变态(Bayer *et al*., 1996; Zhou and Riddiford, 2002)。在完全变态昆虫幼虫阶段 Br 的表达水平很低,而在末龄幼虫期随着 JH 的消失以及少量 20E 的存在,Br 的表达急剧上升从而引起蛹的形成(Zhou and Riddiford, 2002; Konopova and Jindra, 2008),而此时外源添加 JH 类似物,可抑制 20E 诱导的 Br 的表达,从而阻止幼虫化蛹(Zhou and Riddiford, 2001)。Br 作为启动变态的关键转录因子,可促进细胞凋亡因子基因 *rpr*, *hid*, *dronc* 和 *drice* 等的表达从而诱导幼虫相关组织的程序化死亡以及成虫盘的分化(Jiang *et al*., 2000; Cakouros *et al*., 2002; Riddiford *et al*., 2003)。研究表明,*Br* 突变果蝇在预蛹期和蛹期死亡,成虫盘的分化以及幼虫唾液腺及中肠的程序化细胞死亡均受到干扰(Dubrovsky, 2005)。同样,在家蚕和赤拟谷盗中 RNA 干扰 *Br* 的表达,也导致幼虫不能正常化蛹,形成同时具有幼虫和成虫特征的个体(Uhlirova *et al*., 2003; Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy *et al*., 2008)。在果蝇幼虫和成虫表皮中过表达 Br 的同型异构体 Z1(Br-Z1)会导致蛹特征的出现(Zhou and Riddiford, 2002)。基于 Br 在昆虫生长发育中的特性及作用,Br 被称为是"蛹期特异分子"。

Kr-h1 是一种含有 8 个 C_2H_2 锌指结构的转录因子。由于可变剪切的存在，*Kr-h*1 主要有 3 种剪切产物：*Kr-h1α*，*Kr-h1β* 和 *Kr-h1γ*。其中 *Kr-h1α* 和 *Kr-h1γ* 在幼虫整个阶段均有表达，主要调控昆虫的蛹期变态（Minakuchi *et al*., 2008）；而 *Kr-h1β* 在胚胎中含量极其丰富，主要在昆虫的胚胎发育及卵至幼虫的发育过程中起调控作用（Pecasse *et al*., 2000；Beck *et al*., 2004）。尽管在果蝇中最初发现 *Kr-h*1 受 20E 诱导（Pecasse *et al*., 2000），但是更多的研究表明 *Kr-h*1 是 JH 的初级反应基因。在蛹发育至成虫阶段，由于 JH 滴度很低，*Kr-h*1 各个同型异构不表达，而如果在蛹期外源添加 JH 类似物则可促进 *Kr-h*1 的表达（Minakuchi *et al*., 2008）。进一步研究发现，在 JH 缺失果蝇（*Aug*21-*GAL4* > *UAS-Grim*）以及 *Met*/*Gce* 双突变果蝇 $Met^{27}gce^{2.5k}$ 幼虫阶段，*Kr-h*1 的表达水平几乎检测不到，而 Br 却在 2 龄幼虫阶段提前表达，导致 20E 诱导的程序化细胞死亡提前发生，使得 *Aug*21-*GAL4* > *UAS-Grim* 以及 $Met^{27}gce^{2.5k}$ 果蝇在预蛹期死亡（Abdou *et al*., 2011）。在赤拟谷盗末龄前一龄幼虫期，利用 RNAi 干扰 *Met* 或 *Kr-h*1 的表达能导致早熟蛹的出现，与 RNA 干扰 JH 合成途径中甲基转移酶基因（*JHAMT*）造成 JH 缺失的表型一致。并且，JH 也可通过 Met 调节 *Kr-h*1 的转录，进而影响 *Br* 的表达（Konopova and Jindra, 2008；Parthasarathy *et al*., 2008；Minakuchi *et al*., 2009）。Kayukawa 等（2016）利用家蚕细胞系进行研究，证明 *Kr-h*1 可通过直接结合于 *Br* 启动子区域的 *Kr-h*1 结合位点（*Kr-h*1 binding site, KBS），从而抑制 20E 诱导的 Br 的表达。概括来讲，在完全变态昆虫中，JH 通过 Met 和下游初级反应基因 *Kr-h*1 阻碍 20E 信号通路中蛹期特异分子 Br 的表达，从而抑制幼虫至蛹的变态发生。

同样，不完全变态昆虫中的研究表明，JH 也是通过 Met 和 *Kr-h*1 调控昆虫的变态。始红蝽以及德国小蠊中的研究发现 *Kr-h*1 也是在若虫期持续表达直到末龄若虫期降低（Konopova *et al*., 2011；Lozano and Belles, 2011）。该表达模式保证了成虫的正常发育。若在末龄若虫期施加 JH 则可诱导 *Kr-h*1 的再次表达引起超龄若虫的产生。在末龄前一龄若虫期，RNAi 干扰 *Met* 或 *Kr-h*1 的表达，可导致成虫体色、翅以及性器官的提前出现，引起早熟成虫的形成（Konopova *et al*., 2011；Lozano and Belles, 2011）。但是与完全变态昆虫中 *Br* 仅表达于变态期不同，不完全变态昆虫的若虫各个阶段均有 *Br* 的表达，仅在末龄若虫期，随着 JH 的消失，*Br* 的转录水平也随之降低，该表达模式类似于 *Kr-h*1（Konopova *et al*., 2011；Huang *et al*., 2013）。功能研究发现，Br 并不参与不完全变态昆虫的变态发育，而更多的是与翅原基中细胞的增殖有关。RNAi 降低 *Br* 的表达并不影响若虫至成虫的变态，但可引起成虫翅变小以及前翅脉出现缺陷等表型（Konopova *et al*., 2011；Huang *et al*., 2013）。

综上所述，无论是在完全变态昆虫还是不完全变态昆虫中，*Kr-h*1 是 JH 调控昆虫变态发育的关键因子。但是值得注意的是，始红蝽以及家蚕中的研究发现，若在早期 1－2 龄若虫或幼虫阶段 RNAi 降低 *Kr-h*1 的表达并不能引起昆虫提前变态（Smykal *et al*., 2014）。同样在 JH 合成受阻的 $JHAMT^{-/-}$；*mod* 双突变家蚕以及 JH 信号中断的 $Met1^{-/-}$ 家蚕中也发现，即使 *Kr-h*1 的表达在以上两种家蚕突变体中几乎检测不到，但是 *Br* 并没有在 1 龄和 2 龄幼虫阶段提前表达，相应的在 1 龄和 2 龄幼虫阶段也未出现提前化蛹的现象，而最早也是在 3 龄幼虫期产生提前变态的表型（Daimon *et al*., 2015），表明昆虫的早期胚后发育是不依赖于 JH 以及 Met-Kr-h1 信号通路，只有在末龄幼虫/若虫阶段，当昆虫达到“临界体重（critical weight）”时，JH 才发挥其调控昆虫变态的作用。此外，家蚕中超表达 Kr-h1 虽然可以导致家蚕不完全化蛹，但并未引起额外幼虫龄期的产生，且 Br 的表达也未受抑制，说明 Kr-h1 本身并不足以抑制蛹的形成（Kayukawa *et al*., 2014）。

2.2 JH-Met-Kr-h1-E93 信号通路

在不完全变态昆虫由若虫羽化成成虫以及完全变态昆虫由蛹羽化成成虫的过程中，E93 被鉴定为是其中另一重要的调控分子。Urena 等（2014）研究证明 E93 可作为成虫特异分子“adult specifier”促进不完全变态昆虫（德国小蠊）以及完全变态昆虫（果蝇及赤拟谷盗）羽化成成虫。E93 是具有 Pipsqueak（Psq）结构域的转录因子，最早报道参与调控果蝇预蛹期幼虫组织器官的程序化细胞死亡（Baehrecke and Thummel, 1995）。Urena 等（2014）通过搜寻控制德国小蠊羽化前前胸腺的退化以及在蜕变器官（翅及表皮）中高表达的基因时，发现 *E*93 在德国小蠊末龄若虫的所有蜕变器官中表达量很高，而在非蜕变组织如脂肪体中没有太大变化。在德国小蠊末龄前一龄或末龄若虫期，对 *E*93 进行 RNAi 干扰可阻止成虫羽化，而形成超龄若虫。如前所述，末龄幼虫（若虫）中 JH 滴度的缺失以及 *Kr-h*1

表达下降是昆虫变态发育的必要条件。检测 *E*93 RNAi 末龄若虫期 JH 滴度及 *Kr-h*1 mRNA 水平，发现 JH 的滴度正常下降而 *Kr-h*1 转录水平显著高于正常若虫，表明在末龄若虫阶段 E93 通过负调控 *Kr-h*1 导致其表达量降低，从而使幼虫正常羽化成成虫(Urena *et al*., 2014)。此外，Belles 和 Santos (2014)研究发现，在德国小蠊刚发育至末龄前一龄时 RNAi 降低 *Kr-h*1 的表达可导致 *E*93 在末龄前一龄的第 4 天和第 6 天时表达量升高，表明 *Kr-h*1 也可负调控 *E*93。类似于 *E*93 在德国小蠊末龄若虫阶段的作用，*E*93 在赤拟谷盗以及果蝇预蛹期和蛹期中的表达逐渐上升，RNAi 干扰 *E*93 的表达可导致成虫羽化受阻而形成次级蛹(赤拟谷盗)或在蛹期死亡(果蝇)(Urena *et al*., 2014)。以上研究结果表明 E93 作为“成虫特异分子”在昆虫中是高度保守的。Kayukawa 等(2017)最新研究发现，家蚕 *E*93 启动子区域存在保守的 14 bp 的 KBS，推测 *Kr-h*1 受 JH 诱导表达后直接与 *E*93 启动子区域的 KBS 结合后抑制 *E*93 的表达，从而防止幼虫提前变态为成虫。

综上所述，JH 调控昆虫变态发育的分子机制可概括为：(1)对于不完全变态昆虫，在若虫前期，由于 JH 及其效应分子 *Kr-h*1 的存在抑制了成虫特异分子 E93 的活性，使得昆虫维持若虫状态；在末龄若虫阶段，高表达的 *E*93 以及低滴度的 JH 导致 *Kr-h*1 表达下降，从而保证了若虫正常羽化成成虫。(2)对于完全变态昆虫，其幼虫阶段类似于不完全变态昆虫的若虫前期，由于 JH 和 *Kr-h*1 的存在抑制了蛹期特异分子 Br 的表达，使得幼虫蜕皮之后仍然维持幼虫状态。而在末龄幼虫阶段随着 JH 滴度缺失和 *Kr-h*1 表达下降导致 *Br* 表达增强从而诱导昆虫化蛹。而完全变态昆虫的蛹期类似于不完全变态昆虫末龄若虫期，此时高表达的 *E*93 抑制 *Br* 和 *Kr-h*1，促使成虫正常羽化(图 2)。

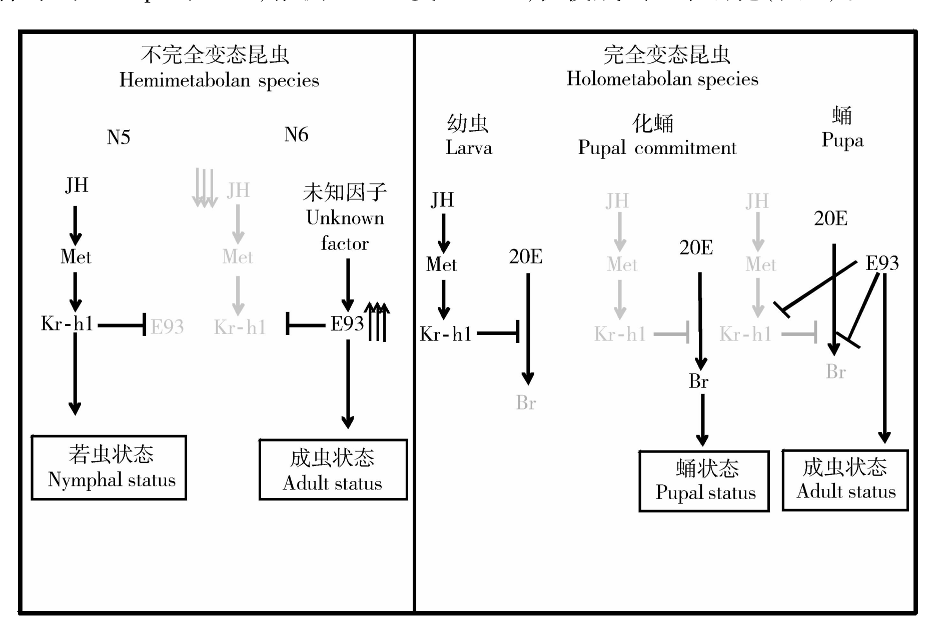


图 2　不完全变态昆虫和完全变态昆虫变态调控的分子机制(改自 Urena *et al*., 2014)

Fig. 2　Molecular mechanisms of metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects (adapted from Urena *et al*., 2014)

3　JH 与 20E 的交互作用

如前所述，昆虫的变态发育受 JH 和 20E 协同调控，二者的交互作用一直以来也是昆虫学领域的一个研究重点。越来越多的研究发现，一些转录因子可能参与 JH 与 20E 的互作，如 Met, USP, Tai/SRC/FISC 和 E75A 等。研究发现，作为 JH 的受体，Met 可与 20E 受体复合物 EcR/USP 结合(Bitra and Palli, 2009; Guo *et al*., 2012)，并且参与 20E 信号传递(Guo *et al*., 2012)。在家蚕游走早期 RNA 干扰 Met 的表达可扰乱 20E 诱导的转录级联反应、阻止幼虫组织的瓦解和成虫组织的形成、导致幼虫至蛹变态过程中死亡。并且 Met 的表达受 20E 诱导，在 20E 滴度较高的蜕皮及化蛹期，Met 的表达量达到高峰。此外，Met 与 EcR/USP 共同结合于 20E 反应元件上，暗示 Met 可能通过招募一些共激活因子后与 EcR/USP 结合而促进 20E 诱导的基因转录。

Tai/SRC/FISC 作为共激活因子与 Met 结合形成的异源二聚体是 JH 的功能受体(Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2012),同时 Tai/SRC/FISC 也可与 20E 的受体复合物 EcR/USP 结合构成 20E 功能受体复合物(Zhu *et al.*, 2006)。赤拟谷盗以及埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中的研究发现,RNAi 降低 *Tai/SRC/FISC* 的表达后既可干扰 JH 诱导的 *Kr-h*1 转录,也显著降低 20E 信号通路中 *E*75 和 *Br* 等的转录水平(Zhu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011)。由此可见,Tai/SRC/FISC 在 JH 和 20E 信号通路中均具有重要的作用。推测在 JH 和 20E 单独存在时,Tai/SRC/FISC 分别与 Met 或 EcR/USP 结合,从而诱导 JH 或 20E 下游反应基因的表达。当 JH 和 20E 同时存在时,Tai/SRC/FISC 既可与 Met 结合,也可与 EcR/USP 结合,从而在 JH 和 20E 功能受体形成过程中产生竞争作用,导致 JH 和 20E 下游反应基因的表达均下降。抑或 JH 和 20E 单独存在时,二者的功能受体所招募的共激活因子与 JH 和 20E 同时存在时有所不同,从而产生了不同的分子效应。因此,对 Tai/SRC/FISC 深入研究,将有助于解析 JH 与 20E 的交互作用。

USP 曾一度被认为是 JH 的候选受体,在 JH 的信号通路中也发挥作用。Jones 和 Sharp(1997)发现 JHⅢ可与 USP 同源二聚体结合,但二者的结合能力非常弱($Kd = 4 \times 10^{-7}$ mol/L),比预期受体的亲和力至少低 100 倍(Jones *et al.*, 2001)。在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 细胞系中,20E 或 JH 均可诱导由多拷贝的 DR1 元件(USP 结合元件)驱动的报告基因的表达,而若 20E 和 JH 同时存在则起协同促进的作用。超表达 USP 可增强 JH 对 DR1 的诱导作用,但对单独 20E 或 20E 和 JH 共同存在时的作用效应无影响(Fang *et al.*, 2005)。因此 Riddiford(2008)认为,JH 单独存在时可通过与 USP 同源二聚体结合而促进基因的表达;而 JH 的协同作用是通过与 EcR/USP 复合物中 USP 结合实现(图 3)。此外,Liu 等(2011)研究发现 USP 可分别以磷酸化状态和非磷酸化状态与 EcR 和 Met 结合,参与 20E 和 JH 信号传递。

此外,JH 还可以通过直接调控 20E 信号通路中基因的表达,实现与 20E 的互作。如在双翅目和鳞翅目昆虫中发现 JH 可促进 20E 诱导的 *E75A* 的转录表达(Dubrovskaya *et al.*, 2004)。JH 对 *E75A* 的转录调控被证明是通过 FTZ-F1 与 Met 或 Gce 结合后,协助 JH 功能受体结合于 *E75A* 启动子区域实现的(Dubrovsky *et al.*, 2011)。果蝇 S2 细胞中的研究发现,在 JH 存在的情况下,超表达 *E75A* 可抑制 20E 诱导的其他早期基因的表达,包括蛹期特异分子 Br (Dubrovsky *et al.*, 2004),推测 E75A 在 JH 发挥其“维持现状”的功能中起着重要的作用。在果蝇 1 龄和 2 龄幼虫阶段,由于 JH 和 20E 存在,高转录水平的 *E75A* 抑制 20E 信号通路中其他基因的表达,使得幼虫蜕皮之后维持幼虫的状态;而在 3 龄幼虫中期,由于 JH 滴度的下降及消失,20E 可促进早期基因 *EcR-B*, *E74B* 以及 *Br* 的表达。一旦 Br 表达,JH 或 E75A 不再对其起抑制作用,从而导致蛹变态的发生。

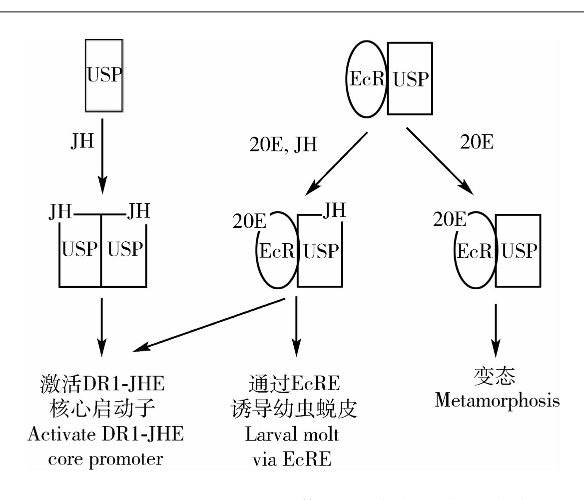


图 3 USP 在 JH 和 20E 信号通路中扮演的角色(引自 Riddiford, 2008)

Fig. 3 The model for the role of USP in JH and 20E signalling (adopted from Riddiford, 2008)

4 JH 的膜受体

JH 除可通过 Met 这一核受体发挥其生理功能外,一些研究表明 JH 可能还具有膜受体。关于 JH 可能通过膜受体与蛋白激酶 C(PKC)来发挥作用的观点,最早是基于果蝇雄性附属腺(Yamamoto *et al.*, 1988)和吸血蝽 *Rhodnius prolixus* 卵泡(Sevala and Davey, 1989)中的研究得出的。对离体培养的果蝇雄性附属腺施加 JH 可显著提高蛋白质的合成,并且该作用依赖于培养基中的 Ca^{2+} 以及 PKC 的活性。当 PKC 活性缺失,JH 对蛋白质合成的促进作用也随之消失(Yamamoto *et al.*, 1988)。在吸血蝽中的研究发现,JH 通过与细胞膜上的特定蛋白结合后激活 PKC、导致 Na^+/K^+ ATPase 活性的上升,从而引

起滤泡上皮细胞的快速收缩使得滤泡细胞之间的间隙增大,有利于卵黄蛋白原穿过滤泡细胞间隙从血淋巴快速地进入到卵母细胞(Sevala and Davey, 1989)。近期在埃及伊蚊中的研究表明,JH 可通过膜受体激活磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)信号通路,引起细胞内三磷酸肌醇、甘油二酯以及 Ca^{2+} 浓度的增加,进而激活钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶Ⅱ(calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ, CaMKⅡ)。CaMKⅡ通过磷酸化 Met 及 Taiman 从而增强 Met-Taiman 复合体的转录活性。当 PLC 或 CaMKⅡ失活,Met 与 JHRE 的结合能力显著降低,从而阻碍了 JH 的信号传递(Liu *et al*., 2015)。此外,研究还发现 JH-膜受体-PLC 信号还可通过激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)调控 Met 与 JHRE 的结合(Ojani *et al*., 2016)。值得一提的是,药物抑制实验结果表明 JH 膜受体更倾向于是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)而不是 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)(Liu *et al*., 2015)。但究竟是哪一个分子作为 JH 的膜受体介导生物体对 JH 的快速应答还有待深入研究。

5　小结与展望

综上所述,近年来有关 JH 对昆虫变态发育调控的分子机制方面的研究已取得了重要的进展,但是新的科学问题也相伴产生。例如,在昆虫变态发育过程中,除 *Kr-h*1 外,还有哪些重要的基因参与 JH 的信号通路? 这些基因又是如何形成紧密的调控网络? JH 的膜受体究竟是哪个分子,JH 是如何通过膜受体传递信号? 究竟 JH 在昆虫胚胎以及早期幼虫或若虫阶段能否发挥作用? 昆虫变态过程中是否存在"感受态因子(competence factor)"来促进变态相关基因如 *Br* 或 *E*93 的表达,以及它是如何将"临界体重"的感知转化为对 *Br* 或 *E*93 的诱导表达? *E*93 的下游调控基因又有哪些? 随着 JH 受体的鉴定以及日新月异的研究手段及技术的出现,相信这些问题在不久的将来将会得到解答。对 JH 分子作用机制更深入的研究,也将更有助于我们进一步了解昆虫生长发育快、繁殖量大、蜕皮变态等特点的内在因素,为更好地利用益虫以及寻找害虫防治的新靶点、新方法奠定更好的理论基础。

参考文献(References)

Abdou MA, He QY, Wen D, Zyaan O, Wang J, Xu JJ, Baumann AA, Joseph J, Wilson TG, Li S, Wang J, 2011. *Drosophila* Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 41(12): 938-945.

Ashok M, Turner C, Wilson TG, 1998. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(6): 2761-2766.

Baehrecke EH, Thummel CS, 1995. The *Drosophila E*93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Dev. Biol*., 171(1): 85-97.

Baumann A, Barry J, Wang S, Fujiwara Y, Wilson TG, 2010a. Paralogous genes involved in juvenile hormone action in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(4): 1327-1336.

Baumann A, Fujiwara Y, Wilson TG, 2010b. Evolutionary divergence of the paralogs *Methoprene tolerant* (*Met*) and *germ cell expressed* (*gce*) within the genus *Drosophila*. *J. Insect Physiol*., 56(10): 1445-1455.

Bayer CA, Holley B, Fristrom JW, 1996. A switch in Broad-Complex zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Biol*., 177(1): 1-14.

Beck Y, Pecasse F, Richards G, 2004. *Krüppel-homolog* is essential for the coordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development. *Dev. Biol*., 268(1): 64-75.

Belles X, Santos CG, 2014. The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Krüppel homolog 1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis, and the homology of the pupal stage. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 52: 60-68.

Bernardo TJ, Dubrovsky EB, 2012. Molecular mechanisms of transcription activation by juvenile hormone: a critical role for bHLH-PAS and nuclear receptor proteins. *Insects*, 3(1): 324-338.

Bitra K, Palli SR, 2009. Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 70(2): 90-105.

Cakouros D, Daish T, Martin D, Baehrecke EH, Kumar S, 2002. Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by Broad-Complex. *J. Cell Biol*., 157(6): 985-995.

Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M, 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(52): 21128-21133.

Daimon T, Uchibori M, Nakao H, Sezutsu H, Shinoda T, 2015. Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(31): E4226-E4235.

Dubrovskaya VA, Berger EM, Dubrovsky EB, 2004. Juvenile hormone regulation of the E75 nuclear receptor is conserved in Diptera and Lepidoptera. *Gene*, 340(2): 171-177.

Dubrovsky EB, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab*., 16(1): 6-11.

Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, 2004. Hormonal regulation and functional role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev. Biol.*, 268(2): 258-270.

Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Bernardo T, Otte V, Difilippo R, Bryan H, 2011. The *Drosophila* FTZ-F1 nuclear receptoe mediates juvenile hormone activation of E75A gene expression through an intracellular pathway. *J. Biol. Chem.*, 286(38): 33689-33700.

Fang F, Xu Y, Jones D, Jones G, 2005. Interaction of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone- and juvenile hormone-signaling. *FEBS J.*, 272(7): 1577-1589.

Godlewski J, Wang S, Wilson TG, 2006. Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342(4): 1305-1311.

Greb-Markiewicz B, Orlowski M, Dobrucki J, Ozyhar A, 2011. Sequences that direct subcellular traffic of the *Drosophila* methoprene-tolerant protein (MET) are located predominantly in the PAS domains. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 345(1-2): 16-26.

Greb-Markiewicz B, Sadowska D, Surgut N, Godlewski J, Zarebski M, Ozyhar A, 2015. Mapping of the sequences directing localization of the *Drosophila* germ cell-expressed protein (GCE). *PLoS ONE*, 10(7): e0133307.

Guo EE, He QY, Liu SM, Tian L, Sheng ZT, Peng Q, Guan JM, Shi MA, Li K, Gilbert LI, Wang J, Cao Y, Li S, 2012. Met is required for the maximal action of 20-hydroxyecdysone during *Bombyx* metamorphosis. *PLoS ONE*, 7(12): e53256.

He QY, Wen D, Jia QQ, Cui CL, Wang J, Palli SR, Li S, 2014. Heat shock protein 83 (Hsp83) facilitates methoprene-tolerant (Met) nuclear import to modulate juvenile hormone signaling. *J. Biol. Chem.*, 289(40): 27874-27885.

He QY, Zhang YX, 2016. Molecular mechanisms regulating the binding capacity of juvenile hormone response region (JHRR) to nuclear proteins in *Drosophila melanogaster*. *Acta Entomol. Sin.*, 59(12): 1325-1331. [何倩毓, 张原熙, 2016. 黑腹果蝇保幼激素反应区(JHRR)与核蛋白结合能力调控的分子机制. 昆虫学报, 59(12): 1325-1331]

He QY, Zhang YX, Zhang X, Xu DD, Dong WT, Li S, Wu R, 2017. Nucleoporin Nup358 facilitates nuclear import of Methoprene-tolerant (Met) in an importin beta- and Hsp83-dependent manner. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 81: 10-18.

Huang JH, Lozano J, Belles X, 2013. Broad-complex functions in postembryonic development of the cockroach *Blattella germanica* shed new light on the evolution of insect metamorphosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830(1): 2178-2187.

Jiang CA, Lamblin AJ, Steller H, Thummel CS, 2000. A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol. Cell*, 5: 445-455.

Jindra M, Uhlirova M, Charles JP, Smykal V, Hill RJ, 2015. Genetic evidence for function of the bHLH-PAS protein Gce/Met as a juvenile hormone receptor. *PLoS Genet.*, 11(7): e1005394.

Jones G, Sharp PA, 1997. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13499-13503.

Jones G, Wozniak M, Chu Y, Dhar S, Jones D, 2001. Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor Ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(1): 33-49.

Kayukawa T, Jouraku A, Ito Y, Shinoda T, 2017. Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(5): 1057-1062.

Kayukawa T, Minakuchi C, Namiki T, Togawa T, Yoshiyama M, Kamimura M, Mita K, Imanishi S, Kiuchi M, Ishikawa Y, Shinoda T, 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Krüppel homolog* 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(29): 11729-11734.

Kayukawa T, Murata M, Kobayashi I, Muramatsu D, Okada C, Uchino K, Sezutsu H, Kiuchi M, Tamura T, Hiruma K, Ishikawa Y, Shinoda T, 2014. Hormonal regulation and developmental role of *Krüppel homolog* 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 388(1): 48-56.

Kayukawa T, Nagamine K, Ito Y, Nishita Y, Ishikawa Y, Shinoda T, 2016. Krüppel homolog 1 inhibits insect metamorphosis via direct transcriptional repression of Broad-Complex, a pupal specific gene. *J. Biol. Chem.*, 291(4): 1751-1762.

Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(25): 10488-10493.

Konopova B, Jindra M, 2008. Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolan metamorphosis. *Development*, 135(3): 559-568.

Konopova B, Smykal V, Jindra M, 2011. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS ONE*, 6(12): e28728.

Li M, Mead EA, Zhu J, 2011. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(2): 638-643.

Liu PC, Peng HJ, Zhu JS, 2015. Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(15): E1871-E1879.

Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF, 2011. The participation of calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS ONE*, 6(5): e19776.

Liu Y, Sheng ZT, Liu HH, Wen D, He QY, Wang S, Shao W, Jiang RJ, An S, Sun Y, Bendena, WG, Wang J, Gilbert LI, Wilson TG, Song Q, Li S, 2009. Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 136(12): 2015-2025.

Lozano J, Belles X, 2011. Conserved repressive function of *Krüppel*

homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Sci. Rep.*, 1: 163.

Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T, 2009. *Krüppel homolog* 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.*, 325(2): 341-350.

Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM, 2008. *Krüppel homolog* 1 (*Kr-h*1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.*, 125(1-2): 91-105.

Miura K, Oda M, Makita S, Chinzei Y, 2005. Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS J.*, 272(5): 1169-1178.

Moore AW, Barbel S, Jan LY, Jan YN, 2000. A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(19): 10436-10441.

Ojani R, Liu PC, Fu XN, Zhu JS, 2016. Protein kinase C modulates transcriptional activation by the juvenile hormone receptor methoprene-tolerant. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 70: 44-52.

Parthasarathy R, Tan A, Palli SR, 2008. bHLH-PAS family transcription factor methoprene-tolerant plays a key role in JH action in preventing the premature development of adult structures during larval-pupal metamorphosis. *Mech. Dev.*, 125(7): 601-616.

Pecasse F, Beck Y, Ruiz C, Richards G, 2000. Kruppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.*, 221(1): 53-67.

Riddiford LM, 2008. Juvenile hormone action: a 2007 perspective. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 895-901.

Riddiford LM, 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen. Comp. Endocrinol.*, 179(3): 477-484.

Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(12): 1327-1338

Sevala VL, Davey KG, 1989. Action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: evidence for a novel regulatory mechanism involving protein kinase C. *Experientia*, 45(4): 355-356.

Shemshedini L, Wilson TG, 1990. Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(6): 2072-2076.

Shin SW, Zou Z, Saha TT, Raikhel AS, 2012. bHLH-PAS heterodimer of methoprene-tolerant and Cycle mediates circadian expression of juvenile hormone-induced mosquito genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(41): 16576-16581.

Smykal V, Daimon T, Kayukawa T, Takaki K, Shinoda T, Jindra M, 2014. Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Dev. Biol.*, 390(2): 221-230.

Uhlirova M, Foy BD, Beaty BJ, Olson KE, Riddiford LM, Jindra M, 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a concerved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(26): 15607-15612.

Urena E, Manjon C, Franch-Marro X, Martin D, 2014. Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(19): 7024-7029.

Wilson TG, Ashok M, 1998. Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24): 14040-14044.

Wilson TG, Fabian J, 1986. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Dev. Biol.*, 118(1): 190-201.

Yamamoto K, Chadarevian A, Pellegrini M, 1988. Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science*, 239(4842): 916-919.

Zhang ZL, Xu JJ, Sheng ZT, Sui YP, Palli SR, 2011. Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *J. Biol. Chem.*, 286(10): 8437-8447.

Zhou BH, Riddiford LM, 2001. Hormonal regulation and patterning of the Broad-Complex in the epedermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, 231(1): 125-137.

Zhou XF, Riddiford LM, 2002. Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development*, 129(9): 2259-2269.

Zhu J, Chen L, Sun G, Raikhel AS, 2006. The competence factor βFtz-F1 potentiates ecdysone receptor activity via recruiting a p160/SRC coactivator. *Mol. Cell. Biol.*, 26(24): 9402-9412.

（责任编辑：赵利辉）